

Temperaturabhängiges Dissoziationsverhalten
von homologen in vivo produzierten
 ^{125}I -J-des-AB Fibrinmonomer-Komplexen

Dieter Sackerer

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0063

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

Temperaturabhängiges Dissoziationsverhalten
von homologen in vivo produzierten
¹²⁵J-des-AB Fibrinmonomer-Komplexen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dieter Sackerer

aus

München

1980



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Graeff
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Zander
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 1980

Einleitung

Meinen lieben Eltern,
die mich in dieser, meine für die Vorbereitung
auf meine **Meinen lieben Eltern** die / 100-
klausur.

Ich möchte hiermit danken für eure große Liebe
und Fürsorge, die mich zu dem, was ich heute
erreichen konnte, geführt hat. Ich hoffe, dass ich
euch damit etwas zurückgeben kann.

Ich hoffe, dass ich euch noch, so oft ich kann,
zu Hause bei mir sein werde.

Danksagung

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof.
Dr. med. H. Graeff, danke ich für die Überlassung
des Themas und die Bereitstellung eines Arbeits-
platzes.

Besonders herzlich möchte ich auch meinem Freund
und Kollegen Dr. René v. Hugo für seine wertvollen
Ratschläge und die tatkräftige Unterstützung bei
der Durchführung der Arbeit danken.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. R. Hafter und
Frl. v. Brunn für die technische Hilfe im Labor.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1.0 Einleitung	1
2.0 Material und Methoden	3
2.1 Kaninchenfibrinogen	3
2.2 Jodierung des Fibrinogens	5
2.3 Herstellung der des-AB Fibrinmonomere	5
2.4 Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten durch Fällung mit β -Alanin	6
2.5 Agarose Gelfiltration	6
2.6 Polyacrylamid Elektrophorese	7
2.7 Versuchstiere	8
3.0 Ergebnisse	10
4.0 Diskussion	18
5.0 Zusammenfassung	22
6.0 Literaturverzeichnis	23
7.0 Lebenslauf	29

1.0 Einleitung

Fibrin und Fibrinogenabbauprodukte als Zeichen eines erhöhten Fibrinogenumsatzes findet man gehäuft bei Gerinnungsveränderungen im Sinne einer Hyperkoagulabilität (1,2). Diese Veränderungen treten unter anderem in der Schwangerschaft, während der Geburt und im frühen Wochenbett (3,4) sowie bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIG) (5,6) auf. Durch die Einwirkung von Faktor II a (Thrombin) wird Fibrinogen in Fibrin umgewandelt. Die dabei zunächst entstehenden Fibrinmonomere bilden in einer reversiblen Reaktion (7,8,9) sowohl mit Fibrinogen als auch untereinander frei dissoziierbare Komplexe (10,11).

Solche Fibrinogen-Fibrin-Zwischenprodukte hatte 1937 bereits Apitz (12) bei in vitro Experimenten gefunden und Profibrin genannt. Die Komplexe waren plasmalöslich und konnten in Abwesenheit von Thrombin nur mit physiko-chemischen Mitteln in ein Fibrinkoagel umgewandelt werden. 1954 beobachteten Thomas et al. (13) ähnliche Fibrin-Zwischenprodukte im Blut von mit Endotoxin behandelten Tieren. Nach der Herstellungsmethode benannten sie es Kryofibrin. Die Zusammensetzung von Kryofibrin aus Fibrin und Fibrinogen, die hierbei reversible Komplexe bilden, beschrieben Shainoff und Page (14, 15). Diese Komplexe mit Fibrinogen bildet sowohl des-A als auch des-AB Fibrin. Des-A Fibrin entsteht nach der Abspaltung der Fibrinopeptide A aus dem Fibrinogenmolekül, während des-AB Fibrin nach der Abspaltung der Fibrinopeptide A und B aus dem Fibrinogenmolekül entsteht.

Bezeichnend für die Hyperkoagulabilität ist der durch die vermehrte Aktivierung von Faktor I (Fibrinogen) signifikant erhöhte Plasmaspiegel von löslichen Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplexen (LFMK) (1,2,16,3,4). Zusätzlich zu den bei der intravasalen Gerinnung erhöhten Fibrin-Fibrinmonomer-Komplexen werden als Folge vermehrter Freisetzung von Faktor II a bei Störung der Mikrozirkulation und Azidose und verstärkter Aktivierung des Fibrin stabilisierenden Faktors XIII lösliche quervernetzte Fibrinoligomere gefunden (5,17).

Die vorliegende Arbeit soll das Abbauverhalten der löslichen Fibrinmonomerkomplexe im homologen System sowie die Auswirkung von Temperaturänderungen auf das Dissoziationsgleichgewicht dieser Komplexe untersuchen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Kaninchenfibrinogen

Blut von Kaninchen, die 48 Stunden vor der Blutentnahme 0,5 ml/kg KG Terpentinöl erhalten hatten, um eine Hyperfibrinogenämie (18) zu induzieren, wurde in einer Anti-koagulans-Lösung (EDTA, Aprotinin, NaCl) von 1/10 des Blutvolumens aufgefangen. Blättchenarmes Plasma wurde durch 10 min. Zentrifugation bei 2000 g und 20 min. Zentrifugation bei 3000 g erhalten. Das Fibrinogen wurde durch eine modifizierte von Kazal et al. (19), Silberstein et al. (20), Blombäck und Blombäck (21) und Mosesson und Sherry (22) beschriebene Methode wie folgt gereinigt:

Der Prothrombinkomplex wurde durch Adsorption an Aluminiumhydroxid entfernt, indem 50 ml Aluminiumhydroxid-Gel (25 g/50 ml H₂O) mit 1000 ml Plasma 30 min. lang gerührt wurden. Nach 15 min. Zentrifugation bei 2000 g wurden 160 g Glycin zu 1000 ml des Überstandes hinzugegeben. Der Niederschlag wurde durch 15 min. Zentrifugation bei 2000 g gesammelt und in Natrium-Citrat-Puffer, der EDTA, EACA und Aprotinin enthielt, gelöst. Die Glycinfällung bei Raumtemperatur wurde zweimal wiederholt, der Niederschlag nach der dritten Glycinzugabe in Citratpuffer gelöst und über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Lösung durch Ultrazentrifugation von kälteunlöslichem Material getrennt und dann auf - 2° C abgekühlt, während 50 % Äthanol tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 8 % zugegeben wurde. Nachdem der Ansatz eine Stunde gekühlt worden war,

wurde der Niederschlag durch 15 min. Zentrifugation bei 2000 g in der Kühlzentrifuge gesammelt und in Natrium-Citrat-Puffer (0.55 M, pH 7.4) gelöst, um eine Endkonzentration von etwa 20 bis 30 mg Fibrinogen/ml zu erhalten. Diese Lösung wurde noch einmal durch Ultrazentrifugation gereinigt und anschließend bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die Elektrophorese des so gewonnenen Fibrinogens zeigte nur eine Bande. Nach Reduktion mit β -Mercaptoäthanol ergaben sich drei Hauptbanden.

Antikoagulans-Lösung: 0.05 M EDTA (Fa. Merck Darmstadt), 1000 KIU/ml Aprotinin (Trasylol Fa. Bayer Leverkusen) in 0.15 M NaCl

Citrat-Puffer: 0.055 M Natrium-Citrat, 0.05 M ϵ -Aminocaproonsäure (EACA), 0.002 M EDTA, 100 KIU/ml Aprotinin, pH 7.4

Imidazol. NaCl, EDTA, Aprotinin-Puffer: 0.005 M Imidazol, 0.005 M EDTA, 100 KIU/ml Aprotinin gelöst in 0.15 M NaCl auf pH 6.4 eingestellt

Urea-Tris-Puffer: 3 M Harnstoff, 0.05 Tris-hydroxymethylaminomethan

TES-Trasylol-Citrat-Puffer: 0.06 M TES (N-Trishydroxymethyl-2-aminoäthansulfonsäure), 0.081 M NaCl, 0.012 M Natrium-Citrat, 100 KIU Trasylol/ml, pH 7.5

Alle Angaben in Endkonzentrationen

2.2 Jodierung des Fibrinogens

Die Jodierung des Kaninchen-Fibrinogens erfolgte nach der Jod-Monochlorid-Methode von McFarlane (23,24). Unmittelbar vor der Markierung wurde die Jod-Monochlorid-Stammlösung mit 1 M NaCl-Lösung 30-fach verdünnt, um eine Endkonzentration von 0.333 mM JCl zu erreichen. Bei einem angenommenen Molekulargewicht des Fibrinogens von 340000 und der Voraussetzung, daß das Jod zu 100 % an das Protein gebunden wird, können 113 mg Fibrinogen mit 1 ml der 0.333 mM JCl-Lösung im Verhältnis 1:1 (1 Atom Jod auf 1 Molekül Fibrinogen) markiert werden. Das für ein gewünschtes Durchschnittsverhältnis von 0.5 - 1.0 Atom Jod pro Fibrinogenmolekül berechnete Volumen JCl-Lösung wurde mit dem ^{125}J -NaJ gemischt und zu der kalten Fibrinogenlösung zugegeben, die mit Glycin-NaCl-Puffer (1 Teil Puffer auf 2 Teile Fibrinogenlösung) gepuffert war. Ungebundenes ^{125}J wurde durch Filtration des Ansatzes über eine Anionen-Austauscher-Säule (Dowex 2x8, 50 bis 100 mesh) mit 4 ml Säulen-Volumen, die vorher mit 0.005 M Natrium-Citrat in physiologischer Kochsalz-Lösung pH 7.4 äquilibriert worden war, entfernt. Anschließend wurde die Säule noch einmal mit demselben Volumen Puffer gespült. Die markierte Fibrinogen-Lösung wurde aufgeteilt und in der Tiefkühltruhe bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.3 Herstellung der des-AB Fibrinmonomere

Zur Herstellung der Fibrinmonomere wurde 1 mg markiertes Fibrinogen pro kg KG Kaninchen mit 50 NIH Einheiten Thrombin in 1 ml Imidazolpuffer versetzt. Nach 2 Stunden wurde das

gebildete Fibringerinsel mit einem Glashäkchen entnommen, 2mal mit 0.15 M NaCl-Lösung, 1mal mit Aqua dest. gewaschen und anschließend auf Filterpapier getrocknet. Das so gereinigte Fibringerinsel wurde dann in 1 ml Urea-Tris-Puffer gelöst und den Versuchstieren injiziert.

2.4 Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten durch Fällung mit β -Alanin

1 ml Kaninchenplasma wurde mit 1 ml β -Alanin-Lösung (40 %) versetzt. Nach 15 min. Stehen wurde der Niederschlag bei 5000 g (5 min.) abzentrifugiert und in 1 ml TES-Trasyllol-Citrat-Puffer aufgelöst.

2.5 Agarose Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte an 4 % Agarose (Biogel A 15m, 100 - 200 mesh, Bio Rad Lab. München). 1 ml Proben wurden auf 2.4 x 8 mm Glassäulen aufgetragen und mit Tris-NaCl-Citrat-Puffer, pH 7.6 eluiert. Die Durchflußrate betrug 12 ml/h. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 3 ml gesammelt. Die optische Dichte der Fraktionen wurde bei 280 nm mit einem Spektralphotometer Hitachi 121 gemessen und mit einem Vielfachschreiber aufgezeichnet.

Zur Klärung der Temperaturabhängigkeit der des-AB Fibrin-monomer-Komplexbildung wurden in einem zweiten Versuch in parallelen Läufen die Gelfiltrationen mit einer thermostatisierbaren Säule sowohl bei 37° C als auch bei 20° C durchgeführt.

Messung der Radioaktivität

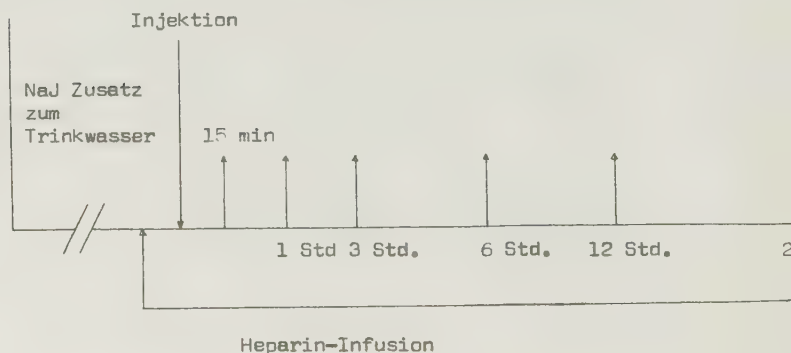
Die Radioaktivitätsmessung der ^{125}J enthaltenden Proben erfolgte in einem Szintillationszähler Gammaszint BF 5300 (Fa. Berthold, Wildbad) einschließlich des dazugehörigen Tischrechners Alphatronic 332 (Fa. Diehl Datensysteme, Nürnberg).

2.6 Polyacrylamid Elektrophorese

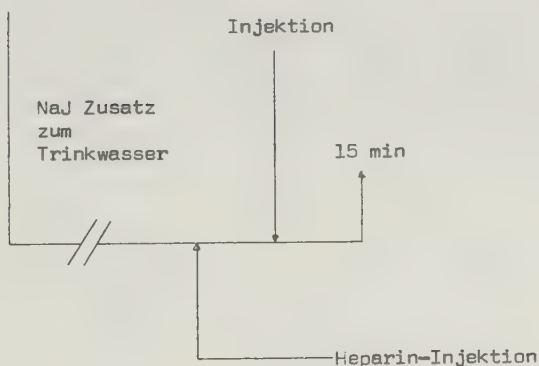
Die Elektrophorese wurde wie von Weber und Osborne beschrieben (25) in einem wassergekühlten Rundgel-Elektrophorese-Apparat (Desaga, Heidelberg) durchgeführt. Nach Dialyse der Probe mit 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 wurde die Elektrophorese in 5 % Polyacrylamid mit 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.6 bei 4°C und einer Spannung von 60 V sowie einer Stromstärke von 60 mA über 12 Std. durchgeführt. Die Reduktion erfolgte durch 2-Std.-Inkubation bei 37°C mit 1%igem β -Mercaptoäthanol, 0.2%igem Natriumdodecylsulfat und 6 M Harnstoff. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in 7.5%igem Polyacrylamidgel mit 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2, der 6 M Harnstoff und 0.1 % Natriumdodecylsulfat enthielt, bei 20°C sowie einer Spannung von 60 V und einer Stromstärke von 60 mA über 8 Std. Gefärbt wurden die Gele mit Coomassie Brilliantblau-Lsg., die Entfärbung wurde mit 7.5%iger Essigsäure und einem Methanol-Essigsäuregemisch 1:1 durchgeführt.

2.7 Versuchstiere

Männliche und nicht trächtige weibliche Kaninchen zwischen 1.5 und 2.5 kg wurden eingesetzt. Sie wurden mit Kaninchentrockenfutter und Trinkwasser, dem vom 3. Tag vor Versuchsbeginn an 1 g/l Natriumjodid zugesetzt worden war, ad lib. gefüttert. 2 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere mit Heparin 1000 IE/kg KG pro 24 h antikoaguliert. Das Heparin wurde kontinuierlich über einen Teflonkatheter (Abbocath 20 G 0.06 cm, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois), der in der lateralen Ohrvene fixiert war, mit Hilfe einer Perfusorspritze zugeführt. Nach Injektion des Ansatzes in die andere freie Ohrvene wurde nach 15 min., 1 Std., 3 Std., 6 Std., 12 Std. und 24 Std. Blut aus dem liegenden Katheter entnommen und in einem EDTA-Röhrchen gesammelt. Die Proben wurden je 5 min. bei 2500 g und 5000 g zentrifugiert. 1 ml des überstehenden Plasmas wurde in einem Zählrohr gecountet und bei -30°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.



In einem zweiten Versuch wurden zur Klärung der Temperaturabhängigkeit der Bildung von des-AB Fibrinmonomer-Komplexen die Versuchstiere 2 Std. vor Versuchsbeginn mit 1000 IE Heparin/kg/KG s. c. antikoaguliert. Nach Injektion des Ansatzes in eine laterale Ohrvene wurde 15 min. später Blut aus der lateralen Ohrvene des anderen Ohres entnommen, in einem EDTA-Röhrchen gesammelt und wie oben beschrieben abzentrifugiert; eine Probe bei 37⁰ C im Wärmeschrank, um Temperaturverluste zu vermeiden, die andere bei Raumtemperatur. Anschließend wurde jeweils 1 ml des entsprechenden Plasmas sowohl auf die thermostatisierte als auch auf die bei Raumtemperatur laufende Säule aufgetragen und mit dem oben beschriebenen Säulenpuffer eluiert.



3.0 Ergebnisse

Die Gelfiltration des nach der oben beschriebenen Methode gewonnenen Kaninchenplasmas über 4%ige Agarose zeigte, daß bei 20⁰ C der überwiegende Aktivitätsanteil mit dem Ausschlußvolumen eluiert wird. (Abb. 1)

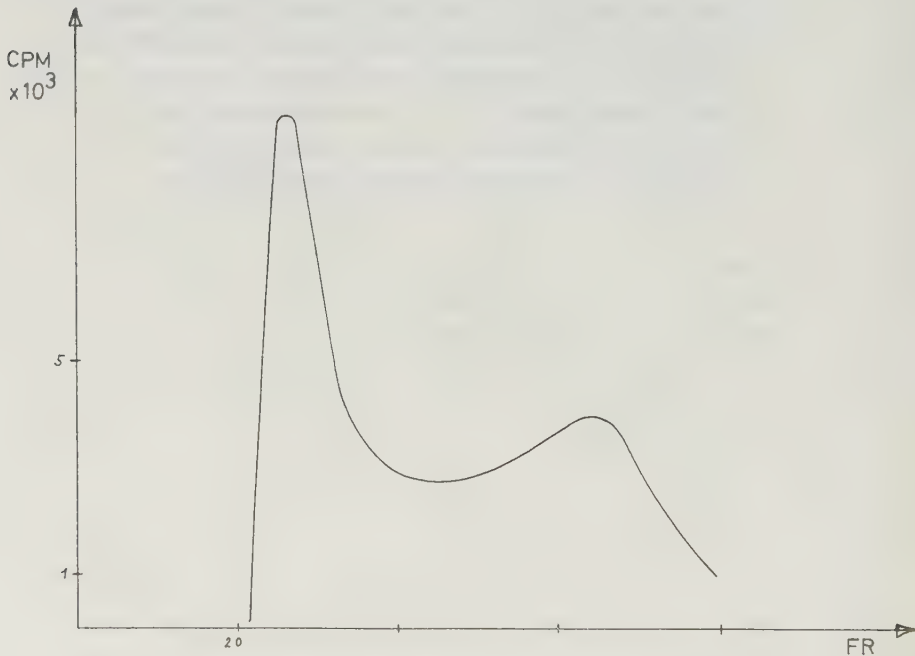


Abb. 1: Radioaktivitätsverteilung von Kaninchenplasma nach 4%iger Agarose-Gelfiltration bei 20⁰ C gewonnen 15 min. nach Injektion von ¹²⁵J-markiertem Fibrinogen nach Inkubation mit Thrombin.

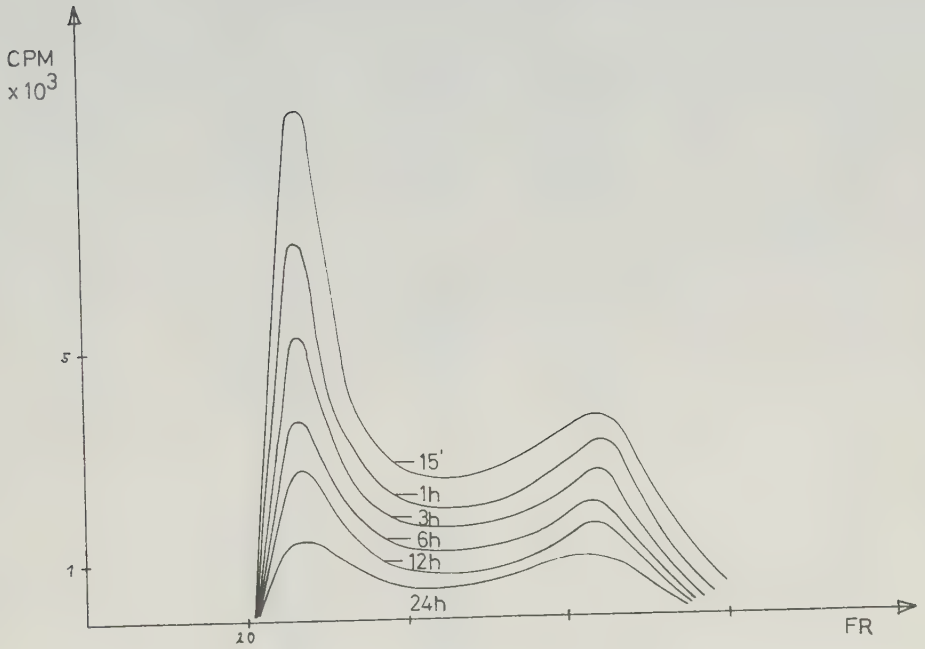


Abb. 2: Radioaktivitätsverteilung von Kaninchenplasma nach 4%iger Agarose-Gelfiltration bei 20° C gewonnen 15', 1 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Injektion von ^{125}J -markiertem Fibrinogen nach Inkubation mit Thrombin.

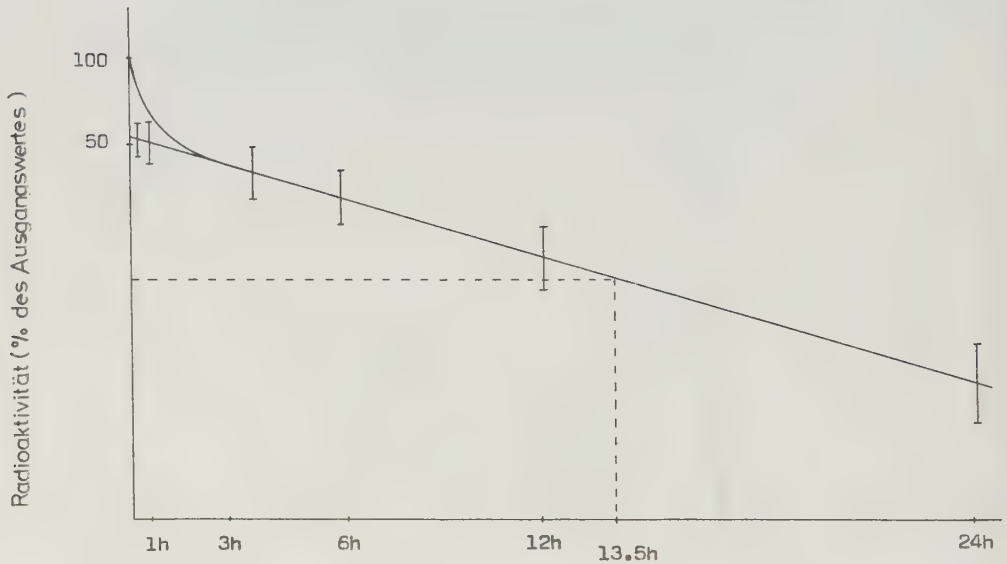


Abb. 3: Abbaukurve der des-AB Fibrinmonomer-Komplexe bei Kaninchen ($n = 6$) in halblogarithmischer Darstellung, erstellt aus den jeweiligen Mittelwerten der Plasmaproben nach 4%iger Agarose-Gelfiltration bei 20°C . Die Halbwertszeit wurde durch Interpolation unter Ausschluß des exponentiellen Abfalles in der ersten Abbauphase mit 13.5 h ermittelt.

	Überstand	Fällung	%
15'	2560	364479	100
1 h	6782	316529	86.8
3 h	10852	244479	67.1
6 h	11773	176683	48.5
12 h	13833	123629	33.9
24 h	16379	79547	21.8

15'	7988	199221	100
1 h	15231	170359	85.5
3 h	15954	113596	57.0
6 h	15678	84488	42.4
12 h	14183	53432	26.8
24 h	8700	31491	15.8

15'	3117	219458	100
1 h	5962	187203	85.3
3 h	7886	134726	61.3
6 h	9359	101498	46.2
12 h	10429	70140	32.0
24 h	9709	32733	14.9

15'	6091	244353	100
1 h	7759	219382	89.8
3 h	10084	135304	55.3
6 h	14658	91224	37.3
12 h	14445	54875	22.4
24 h	9228	34392	14.1

	Überstand	Fällung	%
15'	3032	229655	100
1 h	4214	183968	80.1
3 h	7067	139178	60.6
6 h	1475	107078	46.6
12 h	1468	68791	29.9
24 h	8092	35366	15.4

15'	1924	172972	100
1 h	3050	136173	78.7
3 h	3999	108013	62.4
6 h	5026	82970	47.9
12 h	6237	58505	33.8
24 h	8582	31574	18.2

Tab. 1: Einzelwerte der 6 durchgeführten Ansätze, wobei die Radioaktivität des nach β -Alaninfällung verbleibenden Überstandes und die Radioaktivität des Fällungsproduktes getrennt aufgeführt werden.

	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	$\bar{x}$	s
15'	100	100	100	100	100	100	100	0
1 h	86.8	85.5	85.3	89.8	80.1	78.7	84.37	4.19
3 h	67.1	57.0	61.3	55.3	60.6	62.4	60.62	4.17
6 h	48.5	42.4	46.2	37.3	46.6	47.9	44.82	4.25
12 h	33.9	26.8	32.0	22.4	29.9	33.8	29.8	4.5
24 h	21.8	15.9	14.9	14.1	15.4	18.2	16.72	2.85

Tab. 2: Einzelwerte zu Abb. 3. Angaben in % des Ausgangswertes.

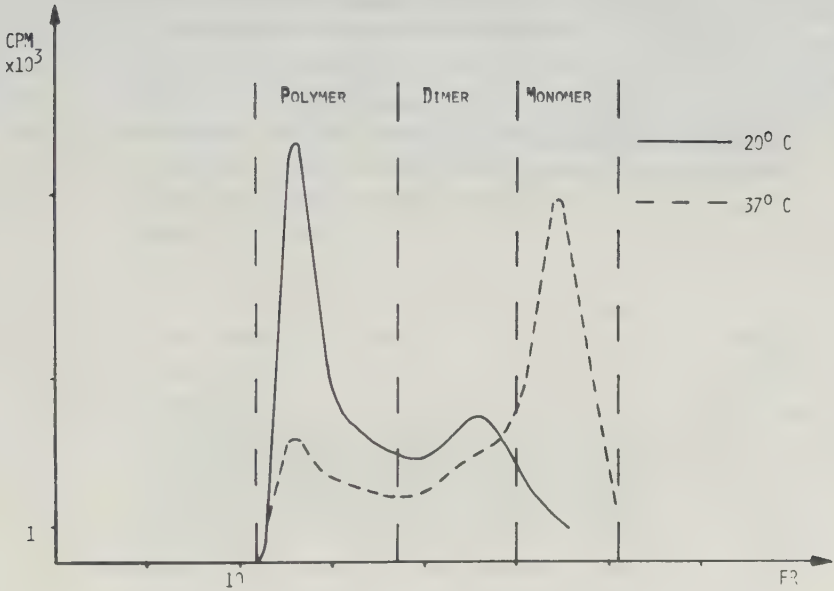


Abb. 4: Radioaktivitätsverteilung von Kaninchenplasma nach 4%iger Agarose-Gelfiltration bei 20^o C und 37^o C gewonnen 15' nach Injektion von ¹²⁵I-markiertem Fibrinogen nach Inkubation mit Thrombin.

20° C		37° C	
POLYMER	DIMER	POLYMER-DIMER	MONOMER
$\bar{x} = 63$ $\pm = 9.8$	$\bar{x} = 37$ $s = \pm 9.8$	$\bar{x} = 44$ $s = \pm 4.6$	$\bar{x} = 56$ $s = \pm 4.6$

Abb. 5: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität
(siehe auch Abb. 4) von Kaninchenplasma
nach 4%iger Agarose-Gelfiltration bei 20° C
und 37° C gewonnen 15 min. nach Injektion
von ¹²⁵J-markiertem Fibrinogen nach Inkubation
mit Thrombin.

Die Gelfiltration der von Kaninchen nach Injektion von mit ^{125}J markiertem Fibrinogen und Inkubation mit Thrombin gewonnenen Plasmaproben an 4%iger Agarose ergab eine charakteristische, reproduzierbare Verteilung der Radioaktivität von des-AB Fibrinmonomeren und Fibrinogen.

Aus den Mittelwerten von 6 Kaninchen wurde durch Interpolation, die den exponentiellen Abfall der Kurve in den ersten Stunden nicht berücksichtigt, eine Halbwertszeit für die des-AB Fibrinmonomer-Komplexe von 13.5 Std. ermittelt (Abb. 3).

Die Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des Dissoziationsverhaltens der des-AB Fibrinmonomer-Komplexe zeigte, daß bei 20°C ^{125}J -des-AB-Fibrin nur in Komplexen auftritt, die ein höheres Molekulargewicht als Fibrinogen besitzen. Diese Komplexe setzen sich zu 63 % aus Polymeren und zu 37 % aus Dimeren zusammen. An der Elutionsposition des monomeren Fibrinogen ist keine Radioaktivität nachweisbar.

Bei 37°C dissoziiert ein großer Teil der Polymere, so daß insgesamt 44 % des ^{125}J -des-AB-Fibrin zu gleichen Teilen aus Polymeren und Dimeren als Komplexe vorliegen. 56 % der Aktivität werden als monomeres Fibrin eluiert (Abb. 4 und 5).

4.0 Diskussion

In der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett (3,4) sowie nach operativen Eingriffen und bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen (16) treten Gerinnungsveränderungen im Sinne einer Hyperkoagulabilität auf, die ein erhöhtes Thromboembolierisiko mit sich bringen. Während dieses Stadiums der Hyperkoagulabilität lassen sich lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) im Plasma nachweisen, wobei seit der Einführung der Affinitätschromatographie an unsolubilisiertem Fibrin und Fibrinogen bekannt ist, daß Fibrinogen und Fibrinmonomere wechselseitig in diesen Komplexen ausgetauscht werden können (9). Der Nachweis dieser Komplexe bildet die Grundlage für eine Reihe von Methoden zum Nachweis von in vivo freigesetztem Fibrin als Indikator für Hyperkoagulabilität und intravaskuläre Gerinnung.

Untersuchungen bei Kaninchen, die nach Endotoxininjektion in den Zustand der Hyperkoagulabilität versetzt wurden, ergaben ebenfalls den zwingenden Hinweis, daß auch in vivo Fibrinogen in zirkulierende Fibrinmonomerkomplexe eingebaut werden kann sowie daß diesem Vorgang ein Dissoziationsgleichgewicht zugrunde liegt (6).

Durch Inkubation von Fibrinogen mit Thrombin in Anwesenheit von Aprotinin und EDTA, um die proteolytische Wirkung von Plasmin bzw. die Quervernetzung durch Faktor XIII zu verhindern, erhielten wir des-AB Fibrinmonomere (30). Durch Agarose-Gelfiltration konnten die

Fibrinmonomerkomplexe von den niedermolekularen Anteilen abgetrennt und so das Profil ihres zeitlichen Verschwindens aus der Blutbahn mit einer Halbwertszeit von 13,5 Stunden erhalten werden.

Von verschiedenen Autoren wird berichtet, daß während des Filtrationsvorganges Fibrin zu einem gewissen Prozentsatz auf der mit Puffer äquilibrierten Säule ausfällt (26,27). In unseren Experimenten mit ^{125}J -des-AB-Fibrin beobachteten wir einen Aktivitätsverlust von etwa 50 % nach der Gelchromatographie im Verhältnis zur entsprechenden Plasmaprobe. Zwischen 20°C und 37°C bestand kein Unterschied in der Wiederfindungsrate. Dieser Aktivitätsverlust ist möglicherweise durch den Markierungsprozeß bzw. durch die Herstellung des des-AB-Fibrin in Harnstoff bedingt. Es können aus diesem Experiment deshalb keine Rückschlüsse auf den Verlust von in vivo gebildeten löslichen Fibrinmonomerkomplexen gezogen werden. Außerdem ist Fibrin in Fibrinmonomerkomplexen, die während eines Zustandes der Hyperkoagulabilität beobachtet werden, meist gering mit Plasmin verunreinigt, wodurch seine Löslichkeit erhöht wird (28). Es wird im allgemeinen angenommen, daß ein Fibrinogenüberschuß notwendig ist, um Fibrin in Lösung zu halten. Aufgrund unserer Ergebnisse kann auch nichts über den Fibrinogengehalt der ^{125}J -des-AB-Fibrinmonomerkomplexe ausgesagt werden, da nur der Fibrinanteil radioaktiv markiert war. Es konnte aber gezeigt werden, daß Fibrin, das bei 20°C nur in komplexierter Form nachgewiesen wird,

bei 37° C zu etwa gleichen Teilen in monomerer und komplexgebundener Form vorliegt.

Man kann annehmen, daß durch die Temperaturerhöhung die Affinität zwischen Fibrinogen und des-AB Fibrin herabgesetzt wird. Jedoch kann das Ausmaß der Dissoziation durch die Anwesenheit von Fibrinogen beeinflußt werden. Sasaki und Mitarbeiter (30) beobachteten, daß Fibrinkomplexe bei niedrigen Fibrinogenkonzentrationen dissoziieren, jedoch nicht bei hohen Konzentrationen an Fibrinogen. Unsere Ergebnisse, daß bei 37° C noch 44 % des des-AB Fibrin in hochmolekularer Form eluiert werden, können die Annahme bestätigen, daß durch einen Überschuß an Fibrinogen die Dissoziation der Fibrinmonomerkomplexe herabgesetzt wird. Andererseits muß in Erwägung gezogen werden, daß während des Filtrationsvorganges bei 37° C eine vermehrte Polymerisation von des-AB Fibrin stattfindet, woraus lösliche des-AB Fibrinpolymere resultieren, die zusammen mit dem komplexgebundenen Fibrin eluiert werden. Beide Arten der Wechselwirkung können dazu beitragen, das gefundene Verhalten zu erklären.

Die in vivo Bedeutung der Thermodissoziation zur Lösungsvermittlung ist sicher begrenzt, da die Versuche in einem künstlichen Puffersystem durchgeführt wurden. In diesem Zusammenhang sollte auch bedacht werden, daß Calcium eine wichtige Rolle bei dem

nichtenzymatischen reversiblen Stadium der Fibrinpolymerisation spielt. Es beschleunigt die Polymerisation und verkürzt die nachfolgende Koagelbildung. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Wechselwirkung zwischen Fibrinogen und des-AB Fibrin bei 37° C zu klären und der Frage nachzugehen, ob die Thermodissoziation ein bedeutsamer Faktor bei der Löslichkeitsvermittlung von intravasal gebildetem Fibrin ist.

5.0 Zusammenfassung

Inkubiert man Fibrinogen mit Thrombin in Gegenwart von Aprotinin und EDTA, so entstehen des-AB Fibrinmonomere. Inkorporiert man Kaninchen Fibrinmonomere, die mit ^{125}J -markiertem Fibrinogen hergestellt wurden, so zeigen zeitlich definierte Plasmaproben eine exponentielle Abnahme der Radioaktivität. Durch Agarose-Gelfiltration wurden die Fibrinmonomerkomplexe von den Dimeren bzw. von Fibrinogen abgetrennt und die Abnahme der Radioaktivität für die einzelnen Fraktionen ermittelt. Daraus ergab sich eine spezifische Abbaukurve der des-AB Fibrinmonomerkomplexe mit einer interpolierten Halbwertszeit von 13,5 Stunden.

Weiter zeigte sich, daß diese löslichen Fibrinmonomerkomplexe bei Temperaturerhöhung von 20°C auf 37°C zu gleichen Teilen in Komplexe niedrigen Molekulargewichts und in monomeres Fibrin dissoziieren. Man kann davon ausgehen, daß diese Dissoziation die Löslichkeitsvermittlung von intravasal gebildetem Fibrin günstig beeinflusst.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Fletcher, A. P.,
Alkjaersig, N.
& O'Brien, J.:
Blood hypercoagulability and
thrombosis, in:
Abstract volume III. Inter-
national Congress of Haematology,
Munich, 244, 1970
2. Graeff, H.,
Hugo, R. v.
& Hafter, R.:
In vivo formation of soluble
fibrin monomer complexes in
human plasma, Thrombosis
Research, 3, 465, 1973
3. Graeff, H.,
Wiedemann, A.,
Hugo, R. v.
& Hafter, R.:
Amount and distribution
pattern of soluble fibrin
monomer complexes during
early puerperium,
American Journal of Obstetrics
and Gynecology 124, 21, 1976
4. Hafter, R.,
Schneeberger, T.,
Tafel, K., Ernst, E.
& Graeff, H.:
Bestimmung von löslichen
Fibrin-Monomer-Komplexen zur
Erfassung der Hyperkoagulabilität
in der Schwangerschaft und unter
der Geburt, Geburtshilfe und
Frauenheilkunde 35, 518, 1975
5. Graeff, H.
& Hugo, R. v.:
Identification of fibrinogen
and derivatives in plasma
samples, Thrombosis et
Diathesis haemorrhagica 27,
610, 1972

6. Hafter, R.,
Müller-Berghaus, G.,
Hugo, R. v.
& Graeff, H.:
Estimation and characterisation
of soluble fibrin monomer
complexes during endotoxin-
induced intravascular
coagulation, Thrombosis
Research 10, 711, 1977
7. Brass, E. P.,
Forman, W. B.,
Edwards, R. V.
& Lindan, O.:
Fibrin formation: The role
of fibrinogen-fibrin monomer
complex, Thrombosis and
Haemostasis 36, 37, 1976
8. Donelly, T. H.,
Laskowsky, M. W.,
Notley, N.
& Scheraga, H. A.:
Equilibria in the fibrinogen-
fibrin conversion II.
Reversibility of the polymeri,
Archives of Biochemistry
and Biophysics 56, 369, 1955
9. Hugo, R. v.,
Hafter, R.,
Stemberger, A.
& Graeff, H.:
Soluble fibrin monomer complexes
demonstrated by agarose gel-
filtration and absorbtion on
insolubilized fibrinogen,
Thrombosis et Diathesis
haemorrhagica 34, 216, 1975
10. Bang, N. U.,
Beller, F. K.,
Deutsch, E.
& Mammen, E. F.:
Thrombosis and bleeding
disorders,
Stuttgart, 1971

11. Müller-Berghaus, G.,
Mahn, I.
& Lasch, H. G.:
Induction of glomerular
microclot formation by
fibrin monomer infusion,
Thrombosis et Diathesis
haemorrhagica 29, 375, 1973
12. Apitz, K.:
Über Profibrin I. Die Ent-
stehung und Bedeutung des
Profibrins im Gerinnungs-
verlauf, Zeitschrift für
Gesamte und Experimentelle
Medizin 101, 552, 1937
13. Thomas, L.,
Smith, R. T.
& Korff, R. v.:
Cold-precipitation by heparin
of a protein in rabbit and
human plasma, Proceedings
of the Society of Experimental
Biological Medicine 86, 813,
1954
14. Shainoff, J. R.
& Page, I. H.:
Cofibrins and fibrin-inter-
mediates as indicators of
thrombin activity in vivo,
Circulation Research 8, 1013,
1960
15. Shainoff, J. R.
& Page, I. H.:
Significance of cryoprofibrin
in fibrinogen-fibrin conversion,
Journal of Experimental
Medicine 116, 687, 1962

16. Graeff, H.,
Hugo, R. v.
& Hafter, R.:
Evaluation of hypercoagulability
and intravascular coagulation
by estimation and characterisation
of soluble fibrin monomer com-
plexes, in: Progress in Chemical
Fibrinolysis and Thrombolysis,
Vol. III, Davidson, J. F.,
Raven Press, New York, 1977
17. Hafter, R.
& Hugo, R. v.:
Molecular aspects of defibri-
nation in a reptilase treated
case of dead fetus syndrom,
Thrombosis Research 7, 391, 1975
18. Koj, A.:
The measurement of absolute
and relative synthesis rates
of fibrinogen in vivo,
Biochemical Biophysical Acta 165,
97, 1968
19. Kazal, L. A.,
Amsel, S.,
Miller, O. P.
& Tocantins, L. M.:
The preparation and some pro-
perties of fibrinogen precipitated
from human plasma by glycine,
Proceedings of the Society of
Experimental Biological Medicine
113, 989, 1963
20. Silberstein, E. B.,
Ingraham, S. C.
& Kereiakes, J. G.:
The determination of optimum
glycine concentration for the
preparation of human fibrinogen
at ambient temperatures,
Thrombosis et Diathesis hae-
morrhagica 29, 672, 1973

21. Blombäck, B.
 & Blombäck, M.: Purification of human and bovine fibrinogen, Arkiv Kemi 10, 415, 1956
22. Mosesson, M. W.
 & Sherry, S.: The preparation and properties of human fibrinogen of relatively high solubility, Biochemistry 5, 2829, 1966
23. McFarlane, A. S.: Efficient trace-labelling of proteins with Iodine, Nature 182, 53, 1958
24. McFarlane, A. S.: In vivo behavior of ^{131}I -fibrinogen, Journal of Clinical Investigation 42, 346, 1963
25. Weber, K.
 & Osborne, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis, Journal of Biological Chemistry 244, 4406, 1969
26. Müller-Berghaus, G.,
 Mahn, I.
 & Krell, W.: Formation and dissociation of soluble fibrin complexes in plasma at 20° C and 37° C, Thrombosis Research 14, 561, 1979

7.0 Lebenslauf

Ich, Dieter Sackerer, wurde am 16. November 1946 als Sohn des Bankkaufmanns Ferdinand Sackerer und seiner Frau Erna, geb. Mühldorfer, in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich im Oktober 1957 in das Alte Realgymnasium in München ein, wo ich im Juni 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966 begann ich das Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilian-Universität in München, wo ich im Dezember 1971 die Diplomchemiker-Hauptprüfung ablegte. Im November 1972 begann ich am Institut für Anorganische Chemie der Universität München meine Diplomarbeit, die ich im Juli 1974 abschloß.

Von November 1974 bis März 1976 war ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Pharmakologischen Institut der Universität beschäftigt.

Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1971/72, legte im Sommersemester 1972 mein Vorphysikum, im Sommersemester 1973 mein Physikum und im Sommersemester 1974 den ersten Teil des Staatsexamens ab. Im Sommersemester 1977 bestand ich den letzten Teil des Medizinischen Staatsexamens und erhielt im Oktober 1977 die Approbation.

Seit 1978 bin ich als Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing beschäftigt.

